

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year) 07 May 2001 (07.05.01)	To: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/DE00/02748	Applicant's or agent's file reference 401167GA
International filing date (day/month/year) 11 August 2000 (11.08.00)	Priority date (day/month/year) 14 August 1999 (14.08.99)
Applicant BERTLING, Wolf	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

08 March 2001 (08.03.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Antonia Muller
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTENS**

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

An:

GASSNER, Wolfgang
Nägelsbachstrasse 49a
D-91052 Erlangen
GERMANY

PCT

**MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG**

(Regel 44.1 PCT)

		Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)	27/02/2001
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401167GA		WEITERES VORGEHEN	siehe Punkte 1 und 4 unten
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/02748		Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)	11/08/2000
Anmelder NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEK			

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

FA: 27.04.01 - VF: 27.03.01

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des Internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.

3. **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt werden sind.

noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90^{bis} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlserklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Geertruida Groeneveld-Van der Spek
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (

tzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]: "Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]: "Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]: "Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt." Oder "Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]: "Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 401167GA	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/DE00/02748	International filing date (day/month/year) 11 August 2000 (11.08.00)	Priority date (day/month/year) 14 August 1999 (14.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/86		
Applicant NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 March 2001 (08.03.01)	Date of completion of this report 26 November 2001 (26.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/DE00/02748

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-15 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19) _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

pages 1-23, filed with the letter of 09 November 2001 (09.11.2001)

 the drawings:

pages 1/3-3/3 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: US-A-5 252 712

D2: US-A-4 769 320

D3: WO-A-00/58732.

1. None of the prior art documents cited in the international search report discloses the determining of a ratio between carboxylated and non-carboxylated protein or similar quotients indicated in Claim 1.

The prior art, moreover, is concerned neither with the present problem of interest (enabling the vitamin K-dependent blood clotting status to be determined reliably even a few days after the sample has been collected), nor does it suggest a combination of the known methods for determining the ratio.

The method as per Claims 1-10 and the use in this method as per Claims 15-21 therefore involves an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims 1-10 and 15-23 therefore meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

2. Claims 11-14 relate to a special embodiment of a test kit which is especially adapted for ratio determination (mix signal formation). This embodiment is neither anticipated nor suggested by the closest prior art as per D1 or D2.

Claims 11-14 are therefore also considered novel and inventive (PCT Article 33(2) and (3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

3. D3 discloses a method which relates to the determining of the quotient of carboxylated osteocalcin and unmodified or total osteocalcin (see abstract). Furthermore, test kits containing the specific antibodies for the respective analytes are also disclosed (D3, Claims 9 and 10). As per Claim 20, such test kits are suitable for the method as per the invention.

If the priority of D3 is shown to be valid, the document must be taken into account in the regional phase particularly with respect to Claims 11-14.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

131

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 28 NOV 2001
WIPO

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401167GA-we	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02748	Internationales Anmeldedatum (<i>Tag/Monat/Jahr</i>) 11/08/2000	Prioritätsdatum (<i>Tag/Monat/Tag</i>) 14/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/86		
<p>Anmelder NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEK</p> <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung 		

Datum der Einreichung des Antrags 17/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Hoesel, H Tel. Nr. +49 89 2399 8693



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02748

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-15 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-23 eingegangen am 09/11/2001 mit Schreiben vom 08/11/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02748

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1 - 20
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1 - 20
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1 - 20
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-5,252,712

D2: US-A-4,769,320

D3: WO-A-00 58732

SEKTION V:

1. Keines der im Recherchenbericht genannten Dokumente des Stands der Technik offenbart die Bestimmung eines Verhältnisses zwischen carboxyliertem und nicht carboxyliertem Protein oder ähnlicher in Anspruch 1 genannter Quotienten.

Der Stand der Technik befaßt sich zudem weder mit der vorliegenden Aufgabenstellung (eine zuverlässige Bestimmung des Vitamin K abhängigen Blutgerinnungsstatus auch einige Tage nach der Probenentnahme zu ermöglichen), noch legt er eine Kombination der bekannten Methoden zu einer Verhältnisbestimmung nahe.

Das Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 10 sowie die Verwendung in diesem Verfahren gemäß der Ansprüche 15 - 21 beruht somit auch auf erfinderischer Tätigkeit.

Die Ansprüche 1 - 10, 15 - 23 erfüllen somit die Erfordernisse von Artikel 33(2) und (3) PCT.

2. Die Ansprüche 11 - 14 beziehen sich auf eine besondere Ausführungsart eines Testkits, die besonders für eine Verhältnisbestimmung (Mischsignalbildung) angepaßt ist. Diese Ausführungsart ist durch den nächstliegenden Stand der Technik gemäß D1 oder D2 weder vorweggenommen noch nahegelegt.

Auch die Ansprüche 11 - 14 werden somit als neu und erfinderisch angesehen im Sinne der Artikel 33(2) und (3) PCT angesehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEKTION VI:

3. D3 offenbart eine Methode, die auf der Bestimmung des Quotienten von carboxyliertem Osteocalcin und nativem oder Gesamt-Osteocalcin beruht (siehe Zusammenfassung). Des Weiteren sind Testkits, die spezifische Antikörper für die jeweiligen Analyte enthalten, offenbart (D3, Ansprüche 9 und 10). Derartige Testkits sind gemäß Anspruch 20 für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Sollte sich die Priorität von D3 als gültig erweisen, müßte es in der regionalen Phase besonders hinsichtlich der Ansprüche 11 - 14 berücksichtigt werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Neue Patentansprüche

1. Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten:

5

a) Bereitstellen einer Körperflüssigkeitsprobe, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

10

b) Ermittlung von mindestens zwei Konzentrationen, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einer ersten Konzentration (C1) an carboxyliertem Protein, einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Protein und einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und de-carboxyliertem Protein, wobei die erste Konzentration (C1) unter Verwendung eines ersten Antikörpers (A1), die zweite Konzentration unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2) und die dritte Konzentration (C3) unter Verwendung eines dritten Antikörpers (A3) ermittelt wird,

15

c) Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2)

oder

20

Bildung eines zweiten Quotienten (Q2) aus dritter (C3) und erster Konzentration (C1)

oder

25

Bildung eines dritten Quotienten (Q3) aus dritter (C3) und zweiter Konzentration (C2),

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wobei eine zur Bildung des ersten (Q1), zweiten (Q2) oder dritten Quotienten (Q3) erforderliche und bei Schritt lit. b) nicht ermittelte Konzentration (C1, C2, C3) gemäß folgender Beziehung:

5

$$C_3 - C_2 = C_1$$

errechnet wird

10 und

d) Korrelation des ersten, zweiten oder dritten Quotienten (Q1, Q2, Q3) mit dem Blutgerinnungsstatus.

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei beim Schritt lit. b) zusätzlich mindestens ein erster Kompetitor (K1) zur Ermittlung der ersten Konzentration (C1), ein zweiter Kompetitor (K2) zur Ermittlung der zweiten Konzentration (C2) oder ein dritter Kompetitor (K3) zur Ermittlung der
20 dritten Konzentration (C3) verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens einer der Antikörper (A1, A2, A3) oder mindestens einer der Kompetitoren (K1, K2, K3) mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugiert ist.

30 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei anstatt der Ermittlung der mindestens zwei Konzentrationen gemäß Schritt lit. b) ein dazu korrelierendes Mischsignal unter Verwendung von zwei Antikörpern, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus dem ersten (A1), dem zwei-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ten (A2) und dem dritten Antikörper (A3), und gegebenenfalls mindestens einem der Kompetitoren (K1, K2, K3) erzeugt und ermittelt und direkt mit dem Blutgerinnungsstatus korreliert wird.

5

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Mischsignal eine, insbesondere durch Fluoreszenzfarbstoffe erzeugte, Mischfarbe, ein durch den Förster-Effekt hervorgerufenes Fluoreszenzsignal oder eine durch den Quencher bedingte Ver-
10 minderung eines Fluoreszenzsignals ist.

10

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Körperflüssigkeit Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. ist.

15

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ermittlung der ersten (C1), zweiten (C2) und/oder dritten Konzentration (C3) oder des Mischsignals mittels eines immunologischen Verfahrens erfolgt.

20

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei bei dem immunologischen Verfahren mindestens einer der Antikörper (A1, A2, A3) auf einem Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert ist.
25

25

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (C1), zweite (C2) und/oder dritte Konzentration (C3) und/oder das Mischsignal mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt wird.
30

30

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifi-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

zierbare Protein Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

11. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit einem ersten Antikörper (A1) zur immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration (C1) der carboxylierten Form des Proteins und einem zweiten Antikörper (A2) zur immunologischen Bestimmung einer zweiten Konzentration (C2) der decarboxylierten Form des Proteins,

dadurch gekennzeichnet, daß

erste (A1) und zweite Antikörper (A2) jeweils mit einer Markierungssubstanz konjugiert ist, wobei die Markierungssubstanzen so gewählt sind, daß sie gemeinsam ein Mischsignal erzeugen können.

12. Kit nach Anspruch 11, wobei die Markierungssubstanz ein Enzym, ein Fluoreszenz-Farbstoff oder ein Quencher ist.

13. Kit nach Anspruch 11 oder 12, wobei das Mischsignal eine Mischfarbe, ein durch den Förster-Effekt hervorgerufenes Fluoreszenzsignal oder eine durch einen Quencher bedingte Verminderung eines Fluoreszenzsignals ist.

14. Kit nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei das Protein Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

30

15. Verwendung eines Kits,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

enthaltend mindestens zwei Antikörper, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einem ersten Antikörper (A1) zur immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration (C1) der carboxylierten Form des Proteins, einem zweiten 5 Antikörper (A2) zur immunologischen Bestimmung einer zweiten Konzentration (C2) der decarboxylierten Form des Proteins und einem dritten Antikörper (A3) zur immunologischen Bestimmung einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein,

10

zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei zusätzlich mindestens 15 ein erster Kompetitor (K1) zur Ermittlung der ersten Konzentration (C1), ein zweiter Kompetitor (K2) zur Ermittlung der zweiten Konzentration (C2) oder ein dritter Kompetitor (K3) zur Ermittlung der dritten Konzentration (C3) enthalten ist.

20

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei mindestens einer der enthaltenen Antikörper (A1, A2, A3) oder Kompetitoren (K1, K2, K3) mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugiert ist.

25

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei der erste (A1) und der zweite Antikörper (A2) auf einem Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der Träger ein Teststreifen ist und der erste (A1) und der zweite Antikörper (A2) jeweils auf einem separaten Feld des Teststreifens aufgenommen sind.

5

20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19, wobei ein mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avi-
10 din, konjugierter dritter Antikörper (A3) enthalten ist.

10

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei der dritte Antikörper (A3) auf dem oder einem weiteren Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel,
15 einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert ist.

15

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei der Träger der oder ein weiterer Teststreifen ist und der dritte Antikörper (A3) auf einem Feld des Teststreifens aufgenommen ist.
20

20

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, wobei das Protein Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Ne-phrocalcin oder Osteocalcin ist.

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus.

5

Die Bestimmung des Blutgerinnungsstatus kann indirekt durch Ermittlung der Prothrombinkonzentration in menschlichen Körperflüssigkeiten erfolgen. Bei Prothrombin handelt es sich um ein Protein, welches vorwiegend im Plasma des menschlichen Bluts vorkommt. Dieses Protein ist durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbar. Prothrombin ist mitverantwortlich für die Blutgerinnung. Es wandelt Fibrinogen in Fibrin um.

15 Die durch Prothrombin induzierte Umwandlung des Fibrinogens erfolgt nur dann, wenn Prothrombin in natürlicher carboxylierter Form vorliegt. Die Carboxylierung erfolgt in der Leber durch eine Carboxylase unter Bindung des Co-Faktors Vitamin K. Die Aktivität der Carboxylase ist von der Konzentration an Vitamin K abhängig. Bei reduzierter Aktivität der Carboxylase entsteht eine abnormale nicht carboxylierte Form des Prothrombins, welche nicht gerinnungsaktiv ist.

25 Beim gesunden Menschen liegt das Prothrombin in natürlicher, d.h. carboxylierter, Form vor. Die Carboxylierung wird durch Vitamin-K als Co-Faktor bewirkt. Bei kranken Menschen, insbesondere bei Menschen mit Leberschäden, oder bei Zugabe von Antikoagulantien, kommt Prothrombin auch in der abnormalen Form vor.

30

Das carboxylierte Prothrombin bewirkt eine Gerinnung nur dann, wenn zuvor Ca^{2+} -Ionen gebunden werden. Nur dann ist das carboxylierte Prothrombin in der Lage, an die Membranen der

Blutplättchen zu binden und eine Gerinnung zu bewirken. Nur die carboxylierte Form des Prothrombins kann Calcium binden. Somit lässt der Gehalt an carboxyliertem Prothrombin auf den Blutgerinnungsstatus schließen.

5

Aus der US 4,769,320 ist ein Verfahren bekannt, bei dem die Ermittlung des Gehalts an carboxyliertem Prothrombin unter Verwendung von Antikörpern mittels Immunoassay erfolgt. Die Antikörper sind spezifisch für carboxyliertes Prothrombin in 10 Gegenwart von Calcium. Sie binden nicht an decarboxyliertes Prothrombin. Es wird ein Kit zur Bestimmung des Pegels von carboxyliertem Prothrombin in einer Plasmaprobe beschrieben, der einen solchen Antikörper enthält.

15 Aus der US 5,252,712 ist ein monoklonaler Antikörper bekannt, der spezifisch für nicht-carboxyliertes Prothrombin ist. Unter Verwendung dieses Antikörpers lässt sich mittels Immunoassay die Konzentration an nicht-carboxyliertem Prothrombin ermitteln. Auch damit ist eine Aussage über den Blutgerinnungsstatus möglich.

20 In der US 4,780,410 ist ein Sandwich-Immunoassay-Verfahren zur Quantifizierung von einem decarboxylierten Prothrombin offenbart. Bei dem Verfahren wird ein gegen decarboxyliertes Prothrombin gerichteter immobilisierter monoklonaler Antikörper verwendet. Daran bindendes decarboxyliertes Prothrombin wird mittels eines zweiten gegen Prothrombin gerichteten Antikörpers detektiert. Es wird auch ein Kit zur Durchführung des Verfahrens beschrieben.

30

Aus Kornberg A. et al., Circulation 88 (1993), Seiten 454 - 460 ist es bekannt, die Konzentration von carboxyliertem Prothrombin in einer Probe mittels eines Kompetitors zu bestim-

men. Dabei konkurriert Peroxidase-markiertes Prothrombin als Kompetitor mit dem Prothrombin in der Probe um die Bindung an einem immobilisierten Anti-Prothrombin-Antikörper. Das an dem Anti-Prothrombin-Antikörper gebundene Peroxidase-markierte Prothrombin ist mittels einer Enzymreaktion nachweisbar. Die Größe des dabei entstehenden Signals ist umgekehrt proportional zur Prothrombin-Konzentration in der Probe.

Aus der JP 05 284 994 A sind drei monoklonale Antikörper bekannt. Ein erster bindet spezifisch an humanes decarboxyliertes Prothrombin, ein zweiter spezifisch an humanes Prothrombin, humanes Thrombin und humanes decarboxyliertes Prothrombin und ein dritter spezifisch an humanes decarboxyliertes Prothrombin und humanes Prothrombin.

15

Aus von Kries, R. et al., Thrombosis and Haemostasis 68 (1992), Seiten 383 - 387 ist es bekannt, decarboxyliertes Prothrombin im Blut mittels eines ELISAs mit einem monoklonalen Antikörper zu bestimmen.

20

Nach dem Stand der Technik tritt das Problem auf, daß das zu analysierende Probenmaterial nicht immer unmittelbar nach der Entnahme der Probe analysiert wird. Durch die Versendung des Probenmaterials vergehen mitunter 1 bis 2 Tage. Die meisten der an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren sind hoch empfindlich und schnell inaktiv. Während dieser Zeit wird u.a. sowohl carboxyliertes als auch nicht-carboxyliertes Prothrombin in der Probe abgebaut. Eine Verfälschung der Ergebnisse des Blutgerinnungsstatus ist die Folge.

25

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere die Genauigkeit der Ermittlung des Blutgerinnungsstatus mittels der Be-

stimmung des Prothrombingehalts erhöht werden. Ferner soll ein Kit bereitgestellt werden, der eine genauere Ermittlung des Blutgerinnungsstatus ermöglicht.

5 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 11 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 10 und 12 bis 20.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur indirekten
10 Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein
15 enthält,

b) Ermittlung von mindestens zwei Konzentrationen ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einer ersten Konzentration an carboxyliertem Protein, einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Protein und einer Gesamtkonzentration an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein, wobei die erste Konzentration unter Verwendung eines ersten Antikörpers, die zweite Konzentration unter Verwendung eines zweiten Antikörpers und die dritte Konzentration unter Verwendung eines dritten Antikörpers ermittelt wird,
25

c) Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration
30 oder

Bildung eines zweiten Quotienten aus dritter und erster Konzentration

oder

5 Bildung eines dritten Quotienten aus dritter und zweiter Konzentration,

wobei eine zur Bildung des ersten, zweiten oder dritten Quotienten erforderliche und bei Schritt lit. b) nicht ermittelte Konzentration gemäß folgender Beziehung:

10

$$C_3 - C_2 = C_1$$

errechnet wird

15 und

d) Korrelation des ersten, zweiten oder dritten Quotienten mit dem Blutgerinnungsstatus.

20 Unter einem durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbaren Protein wird ein Protein verstanden, das in Abhängigkeit des Blutgerinnungsstatus anteilig sowohl in carboxylierter als auch in decarboxylierter Form vorliegen kann. Das Protein kann ein leicht von einem Patienten gewinnbares
25 Protein, z.B. ein Protein aus dem Speichel, sein. Das Protein kann ein Protein sein, das derselben prozentualen Hypomodifikation unterliegt wie Prothrombin. Ein Antikörper im Sinne der Erfindung kann ein Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein sonstiger Stoff mit Bindungsspezifität für die carboxylierte Form, die decarboxylierte Form oder beiden Formen
30 des Proteins sein.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, auf der Basis des Gehalts an modifizierbarem Protein den Blutgerinnungsstatus genau zu ermitteln. Durch die Betrachtung sowohl des Gehalts an carboxyliertem Protein als auch des Gehalts an 5 decarboxyliertem Protein und das Inbeziehungsetzen der beiden vorgenannten Proteingehalte werden Fehler bei der Bestimmung des Blutgerinnungsstatus minimiert.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird beim Schritt lit. 10 b) zusätzlich mindestens ein erster Kompetitor zur Ermittlung der ersten Konzentration, ein zweiter Kompetitor zur Ermittlung der zweiten Konzentration oder ein dritter Kompetitor zur Ermittlung der dritten Konzentration verwendet. Bei dem Kompetitor handelt es sich um einen Stoff, der mit dem carboxylierten Protein, dem decarboxylierten Protein oder dem 15 carboxylierten und dem decarboxylierten Protein um die Bindung an einem der Antikörper konkurriert. Der Kompetitor kann das carboxylierte oder decarboxylierte Protein sein, wobei es mit einer Markierungssubstanz versehen ist. Anstatt des vollständigen Proteins kann auch ein Fragment dieses Proteins als 20 Kompetitor verwendet werden.

Vorzugsweise ist mindestens einer der Antikörper oder mindestens einer der Kompetitoren mit einer Markierungssubstanz, 25 insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugiert. Als Enzym kann jedes Enzym verwendet werden, das mittels einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden kann. Die Markierung des Antikörpers 30 mit einem Goldpartikel erlaubt den Nachweis des gebundenen Antikörpers mittels eines Plasmonresonanz-Verfahrens.

Anstatt der Ermittlung der mindestens zwei Konzentrationen gemäß Schritt lit. b) kann auch ein dazu korrelierendes Mischsignal unter Verwendung von zwei Antikörpern, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus dem ersten, dem zweiten und 5 dem dritten Antikörper, und gegebenenfalls mindestens einem der Kompetitoren erzeugt und ermittelt und direkt mit dem Blutgerinnungsstatus korreliert werden. Das Mischsignal entsteht durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Einzelsignale. Es entspricht dem ersten, zweiten oder dritten Quotienten. Die Bildung dieser Quotienten gemäß Schritt lit. c) entfällt. Das Verfahren ist dadurch schneller und einfacher ausführbar. Das Mischsignal kann eine, insbesondere durch Fluoreszenzfarbstoffe erzeugte, Mischfarbe, ein durch den Förster-Effekt hervorgerufenes Fluoreszenzsignal oder eine durch 10 den Quencher bedingte Verminderung eines Fluoreszenzsignals sein. Die Mischfarbe kann auch durch zwei Enzyme erzeugt werden, die jeweils eine spezifische Farbreaktion katalysieren. Bei dem Förster-Effekt findet ein strahlungsloser Energietransfer von einem angeregten ersten Fluorophor auf ein unmittelbar benachbartes zweites Fluorophor statt. Dadurch geht 15 das erste Fluorophor in den Grundzustand über, während das zweite Fluorophor angeregt wird und fluoresziert. Bei dem erfundungsgemäßen Verfahren können z.B. die ersten und zweiten Antikörper mit Fluorophoren konjugiert sein, die den Förster-Effekt ermöglichen. Die Bindung der ersten Antikörper in unmittelbarer Nachbarschaft zu den zweiten Antikörpern kann mittels eines durch den Förster-Effekt hervorgerufenen Fluoreszenzsignals festgestellt werden. Bei einem strahlungslosen Energietransfer vom Fluorophor auf den Quencher findet eine 20 Löschung der Fluoreszenz statt. Das insgesamt meßbare Fluoreszenzsignal wird dadurch vermindert.

Bei der Körperflüssigkeit kann es sich zweckmäßigerverweise um Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. handeln. Geeignet sind grundsätzlich alle Körperflüssigkeiten, in der das modifizierbare Protein in einem Gehalt enthalten ist, der eine Messung ermöglicht.

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal der Erfindung erfolgt die Ermittlung der ersten, zweiten und/oder dritten Konzentration oder des Mischsignals mittels eines immunologischen Verfahrens. Dabei kann bei dem immunologischen Verfahren mindestens einer der Antikörper auf einem Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert sein. Der Kunststoff kann in Form eines Teströhrchens, eines Teststreifens, eines Kunststoffpartikels oder einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorliegen.

Die erste, zweite und/oder dritte Konzentration und/oder das Mischsignal kann mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt werden. Damit ist eine besonders schnelle und einfache Ermittlung des Blutgerinnungsstatus möglich.

Bei dem durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbaren Protein handelt es sich vorzugsweise um einen der in der decarboxylierten Form als "Proteins Induced by Vitamin K Antagonism or Absence" (PIVKA-Faktoren) bezeichneten Gerinnungsfaktoren Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX oder Faktor X, um Nephrocalcin oder um Osteocalcin. Es ist auch möglich, zur Bestimmung des Blutgerinnungsstatus andere Proteine zu benutzen, die von einer Vitamin-K abhängigen Carboxylase carboxyliert werden und ebenfalls mittels oral verabreicherbarer Anticoagulantien beeinflußbar sind. Nephrocalcin ist z.B. im Urin nachweisbar. Es muß bei Benutzung dieses Proteins kein

Blut entnommen werden. Das bedeutet für Patienten, deren Blutgerinnungsstatus laufend überwacht werden muß, eine erhebliche Erleichterung.

5 Es ist ferner ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, wobei mindestens zwei Antikörper enthalten sind, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einem ersten Antikörper zur immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration der carboxylierten Form des Proteins, einem
10 zweiten Antikörper zur immunologischen Bestimmung einer zweiten Konzentration der decarboxylierten Form des Proteins und einem dritten Antikörper zur immunologischen Bestimmung einer Gesamtkonzentration an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein.

15 Es kann sich beim ersten, zweiten und dritten Antikörper um nach dem Stand der Technik bekannte Antikörper handeln. Solche Antikörper sind z.B. aus der US 5,252,712 und US 4,769,320 bekannt, deren Inhalt hiermit in die Beschreibung
20 einbezogen wird.

In dem Kit kann zusätzlich mindestens ein erster Kompetitor zur Ermittlung der ersten Konzentration, ein zweiter Kompetitor zur Ermittlung der zweiten Konzentration oder ein dritter Kompetitor zur Ermittlung der dritten Konzentration enthalten sein. Mindestens einer der in dem Kit enthaltenen Antikörper oder Kompetitoren kann mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Strep-
25 tavidin oder Avidin, konjugiert sein.
30

Vorzugsweise sind der erste und der zweite Antikörper auf einem Träger immobilisiert. Der Träger kann ein Kunststoff, ein

Magnetpartikel, ein Latexpartikel, ein Goldpartikel, ein Teststreifen oder eine Membran sein. Ist der Träger ein Teststreifen, können der erste und der zweite Antikörper jeweils auf einem separaten Feld des Teststreifens aufgenommen sein.

5 Vorzugsweise ist in dem Kit ein mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugierter dritter Antikörper enthalten. Das ermöglicht eine besonders einfache Ermittlung des jeweiligen Gehalts z.B. mittels einer Farbreaktion

10 auf dem Teststreifen.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung ist der dritte Antikörper auf dem oder einem weiteren Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert. Ist der Träger der oder ein weiterer Teststreifen, kann der dritte Antikörper auf einem Feld des Teststreifens aufgenommen sein. Bevorzugt sind in dem Kit mit jeweils einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff oder einem Quencher, konjugierte erste und zweite Antikörper enthalten, wobei die Markierungssubstanzen so gewählt sind, daß sie gemeinsam ein Mischsignal, insbesondere eine Mischfarbe, ein durch den Förster-Effekt hervorgerufenes Fluoreszenzsignal oder eine durch einen Quencher bedingte Verminderung eines Fluoreszenzsignals, erzeugen können. Das Mischsignal entspricht dem ersten Quotienten.

25 Bei dem Protein handelt es sich vorzugsweise um Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Nephrocalcin oder Osteocalcin.

Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand der Zeichnung erläutert: Es zeigen

Fig. 1 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit
5 cPT/dcPT,

Fig. 2 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit
dcPT/cPT und

10 Fig. 3 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit dcPT.

In Fig. 1 ist der Quotient aus den Konzentrationen von carboxyliertem und decarboxyliertem Prothrombin über dem Blutgerinnungsstatus INR aufgetragen. Die Konzentrationen sind hier
15 als OD-Werte gemessen. Bei einem ermittelten Quotienten von 0,5 ergibt sich ein Blutgerinnungsstatus INR von 3,8.

In Fig. 2 ist der Quotient aus den Konzentrationen von decarboxyliertem und carboxyliertem Prothrombin über dem Blutgerinnungsstatus aufgetragen. Es ist ersichtlich, daß der Quotient hier besonders gut mit dem Blutgerinnungsstatus INR korreliert.

Fig. 3 zeigt die nach dem Stand der Technik bekannte Korrelation von dcPT mit dem Blutgerinnungsstatus INR. Diese verändert sich mit zunehmendem Alter der Proben.

Beispiel 1:

Für Serienmessungen besonders geeignet ist der sogenannte
30 ELISA auf einer Mikrotiterplatte.

a) Probenvorbereitung:

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Maxisorb, NUNC) werden über Nacht bei 4°C mit je 50 μ l eines Antikörpers (10 μ g/ml in Carbonatpuffer) beschichtet. Die Kavitäten werden dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen werden eine 5 Stunde bei Zimmertemperatur mit 50 μ l 1% BSA in PBS pro Kavität abgesättigt. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Anschließend werden die folgenden jeweils 1:50 in PBS/0,1% 10 BSA verdünnten Proben aufgetragen (50 μ l/Kavität):

Kalibrierplasmen,
Normalplasma,
Patientenplasma und
15 Prothrombindefizientes Plasma (negative Kontrolle).

Die Mikrotiterplatte wird eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Es werden 50 μ l/Kavität Kaninchen 20 Anti-Gesamt-Prothrombin (10 μ g/ml) zufügt. Dann wird die Mikrotiterplatte eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Kavitäten werden anschließend dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Es werden 50 μ l/Kavität Ziege-anti-Kaninch-Antikörper, Biotin-konjugiert (Dianova, 1:20000 in PBS/0,1% 25 BSA), zufügt. Die Mikrotiterplatte wird eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Es werden 50 μ l/Kavität Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Ro-30 che Diagnostics, 1:1000 in Konjugatpuffer) zufügt. Die Mikrotiterplatte wird eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Zur Durchführung der Entwicklungsreaktion werden $50\mu\text{l}$ /Kavität ABTS-Lösung (Roche Diagnostics, 1mg/ml) zufügt. Die Mikrotitrplatte wird eine halbe bis eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Absorbtionswerte (OD-Werte) werden in einem ELISA-Reader gemessen.

Es versteht sich, daß das Verfahren erheblich verkürzt werden kann, wenn bereits der zur Detektion gebundenen Prothrombins 10 verwendete Anti-Prothrombin-Antikörper eine Markierungssubstanz, wie Peroxidase oder ein anderes Enzym, aufweist. Eine weitere Verkürzung des Verfahrens kann durch Verwendung einer direkt detektierbaren Markierungssubstanz, wie einem Fluorophor, erreicht werden. Bei Verwendung einer solchen Markierungssubstanz ist keine Entwicklungsreaktion erforderlich.

b) Auswertung:

Es werden

20 aa) die OD-Werte des Gesamt-Prothrombins (Kavitäten sind mit monoklonalen Anti-Gesamt-Prothrombin-Antikörpern beschichtet),

25 bb) die OD-Werte des decarboxylierten Prothrombins (Kavitäten sind mit monoklonalen Anti-Decarboxy-Prothrombin-Antikörpern beschichtet) und

30 cc) die OD-Werte des carboxylierten Prothrombins (Differenz zwischen den OD-Werten des Gesamt-Prothrombins und den OD-Werten des decarboxylierten Prothrombins)

bestimmt.

Dann werden Eichkurven aus den gemessenen OD-Werten (siehe Fig. 1 - 3: Punkte A,B,C und D) der Kalibrierplasmen erstellt und der INR der Patientenplasmen berechnet.

5 Es versteht sich, daß der Gerinnungsstatus auch durch Ermittlung der entsprechenden Konzentrationen anderer durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbarer Proteine als Prothrombin ermittelt werden kann. Solche Proteine sind z.B. Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Nephrocalcin oder
10 Osteocalcin.

Beispiel 2:

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Maxisorb, NUNC) werden über Nacht bei 4°C mit je 50 μ l eines gegen carboxyliertes und
15 decarboxyliertes Prothrombin oder eines nur gegen decarboxyliertes Prothrombin gerichteten Antikörpers (10 μ g/ml in Carbonatpuffer) beschichtet. Die Kavitäten werden dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen werden eine Stunde bei Zimmertemperatur mit 50 μ l 1% BSA in PBS pro Kavi-
20 tät abgesättigt. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Peroxidase-markiertes decarboxyliertes Prothrombin wird zusammen mit den folgenden jeweils 1:50 in PBS/0,1% BSA verdünnten Proben in einer Endkonzentrationen von 30 μ g/ml in die Antikörper-beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben (50 μ l/Kavität):

Kalibrierplasmen,
30 Normalplasma,
Patientenplasma und
Prothrombindefizientes Plasma (negative Kontrolle).

Die Mikrotiterplatte wird eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Es werden $50\mu\text{l}/\text{Kavität ABTS-Lösung}$ (Roche Diagnostics, 1mg/ml) zugefügt. Die Mikrotiterplatte wird eine halbe bis eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Die OD-Werte in den Kavitäten der Mikrotiterplatte werden im ELISA-Reader gemessen. Je höher der OD-Wert in einer Kavität ist, desto geringer ist die Konzentration des Prothrombins in der jeweiligen Probe. Die Prothrombinkonzentration im Patientenplasma wird aufgrund einer mittels der Kalibrierplasmen erstellten Eichkurve ermittelt. Mit dem Antikörper gegen carboxyliertes und decarboxyliertes Prothrombin beschichtete Kavitäten werden zur Bestimmung der Gesamtkonzentration des carboxylierten und decarboxylierten Prothrombins verwendet. Kavitäten, die mit dem gegen decarboxyliertes Prothrombin gerichteten Antikörper beschichtet sind, dienen zur Bestimmung der Konzentration an decarboxyliertem Prothrombin. Die ermittelte Gesamtkonzentrationen an carboxyliertem und decarboxyliertem und die Konzentration an decarboxyliertem Prothrombin werden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Aus dem resultierenden Quotienten kann anhand der Quotienten für die Kalibrierplasmen der Gerinnungsstatus ermittelt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten:

5

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

10

b) Ermittlung von mindestens zwei Konzentrationen, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einer ersten Konzentration (C1) an carboxyliertem Protein, einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Protein und einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und de-carboxyliertem Protein, wobei die erste Konzentration (C1) unter Verwendung eines ersten Antikörpers (A1), die zweite Konzentration unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2) und die dritte Konzentration (C3) unter Verwendung eines dritten Antikörpers (A3) ermittelt wird,

20

c) Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2)

oder

25

Bildung eines zweiten Quotienten (Q2) aus dritter (C3) und erster Konzentration (C1)

oder

30

Bildung eines dritten Quotienten (Q3) aus dritter (C3) und zweiter Konzentration (C2),

wobei eine zur Bildung des ersten (Q1), zweiten (Q2) oder dritten Quotienten (Q3) erforderliche und bei Schritt lit. b) nicht ermittelte Konzentration (C1, C2, C3) gemäß folgender Beziehung:

5

$$C_3 - C_2 = C_1$$

errechnet wird

10

und

d) Korrelation des ersten, zweiten oder dritten Quotienten (Q1, Q2, Q3) mit dem Blutgerinnungsstatus.

15

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei beim Schritt lit. b) zusätzlich mindestens ein erster Kompetitor (K1) zur Ermittlung der ersten Konzentration (C1), ein zweiter Kompetitor (K2) zur Ermittlung der zweiten Konzentration (C2) oder ein dritter Kompetitor (K3) zur Ermittlung der dritten Konzentration (C3) verwendet wird.

20

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens einer der Antikörper (A1, A2, A3) oder mindestens einer der Kompetitoren (K1, K2, K3) mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugiert ist.

25

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei anstatt der Ermittlung der mindestens zwei Konzentrationen gemäß Schritt lit. b) ein dazu korrelierendes Mischsignal unter Verwendung von zwei Antikörpern, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus dem ersten (A1), dem zwei-

30

ten (A2) und dem dritten Antikörper (A3), und gegebenenfalls mindestens einem der Kompetitoren (K1, K2, K3) erzeugt und ermittelt und direkt mit dem Blutgerinnungsstatus korreliert wird.

5

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Mischsignal eine, insbesondere durch Fluoreszenzfarbstoffe erzeugte, Mischfarbe, ein durch den Förster-Effekt hervorgerufenes Fluoreszenzsignal oder eine durch den Quencher bedingte Ver-
minderung eines Fluoreszenzsignals ist.

10

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Körperflüssigkeit Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. ist.

15

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ermittlung der ersten (C1), zweiten (C2) und/oder dritten Konzentration (C3) oder des Mischsignals mittels eines immunologischen Verfahrens erfolgt.

20

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei bei dem immunologischen Verfahren mindestens einer der Antikörper (A1, A2, A3) auf einem Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert ist.

25

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (C1), zweite (C2) und/oder dritte Konzentration (C3) und/oder das Mischsignal mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt wird.

30

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifi-

zierbare Protein Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

11. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens zwei Antikörper enthalten sind, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einem ersten Antikörper (A1) zur immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration (C1) der carboxylierten Form des Proteins, einem zweiten Antikörper (A2) zur immunologischen Bestimmung einer zweiten Konzentration (C2)

10 der decarboxylierten Form des Proteins und einem dritten Antikörper (A3) zur immunologischen Bestimmung einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein.

15

12. Kit nach Anspruch 11, wobei zusätzlich mindestens ein erster Kompetitor (K1) zur Ermittlung der ersten Konzentration (C1), ein zweiter Kompetitor (K2) zur Ermittlung der zweiten Konzentration (C2) oder ein dritter Kompetitor (K3) zur Ermittlung der dritten Konzentration (C3) enthalten ist.

20

13. Kit nach Anspruch 11 oder 12, wobei mindestens einer der enthaltenen Antikörper (A1, A2, A3) oder Kompetitoren (K1, K2, K3) mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugiert ist.

25

30 14. Kit nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei der erste (A1) und der zweite Antikörper (A2) auf einem Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, ei-

nem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert sind.

15. Kit nach Anspruch 14, wobei der Träger ein Teststreifen ist und der erste (A1) und der zweite Antikörper (A2) jeweils auf einem separaten Feld des Teststreifens aufgenommen sind.
16. Kit nach Anspruch 14 oder 15, wobei ein mit einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff, einem Quencher, einem Goldpartikel, einem Latexpartikel, Biotin, Streptavidin oder Avidin, konjugierter dritter Antikörper (A3) enthalten ist.
17. Kit nach einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei der dritte Antikörper (A3) auf dem oder einem weiteren Träger, insbesondere einem Kunststoff, einem Magnetpartikel, einem Latexpartikel, einem Goldpartikel, einem Teststreifen oder einer Membran, immobilisiert ist.
18. Kit nach Anspruch 17, wobei der Träger der oder ein weiterer Teststreifen ist und der dritte Antikörper (A3) auf einem Feld des Teststreifens aufgenommen ist.
19. Kit nach Anspruch 17 oder 18, wobei mit jeweils einer Markierungssubstanz, insbesondere einem Enzym, einem Fluoreszenz-Farbstoff oder einem Quencher, konjugierte erste (A1) und zweite Antikörper (A2) enthalten sind, wobei die Markierungssubstanzen so gewählt sind, daß sie gemeinsam ein Mischsignal, insbesondere eine Mischfarbe, ein durch den Förster-Effekt hervorgerufenes Fluoreszenzsignal oder eine durch einen Quencher bedingte Verminderung eines Fluoreszenzsignals, erzeugen können.

20. Kit nach einem der Ansprüche 11 bis 19, wobei das Protein Prothrombin, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

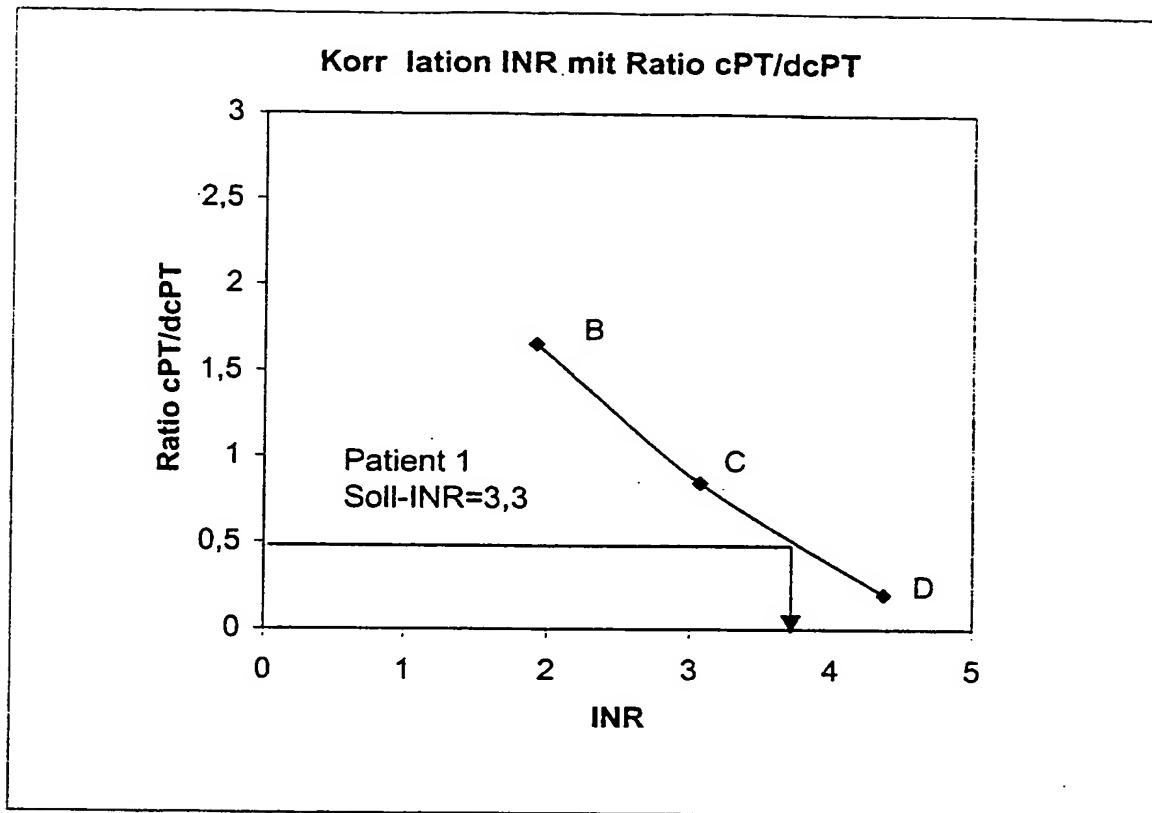


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

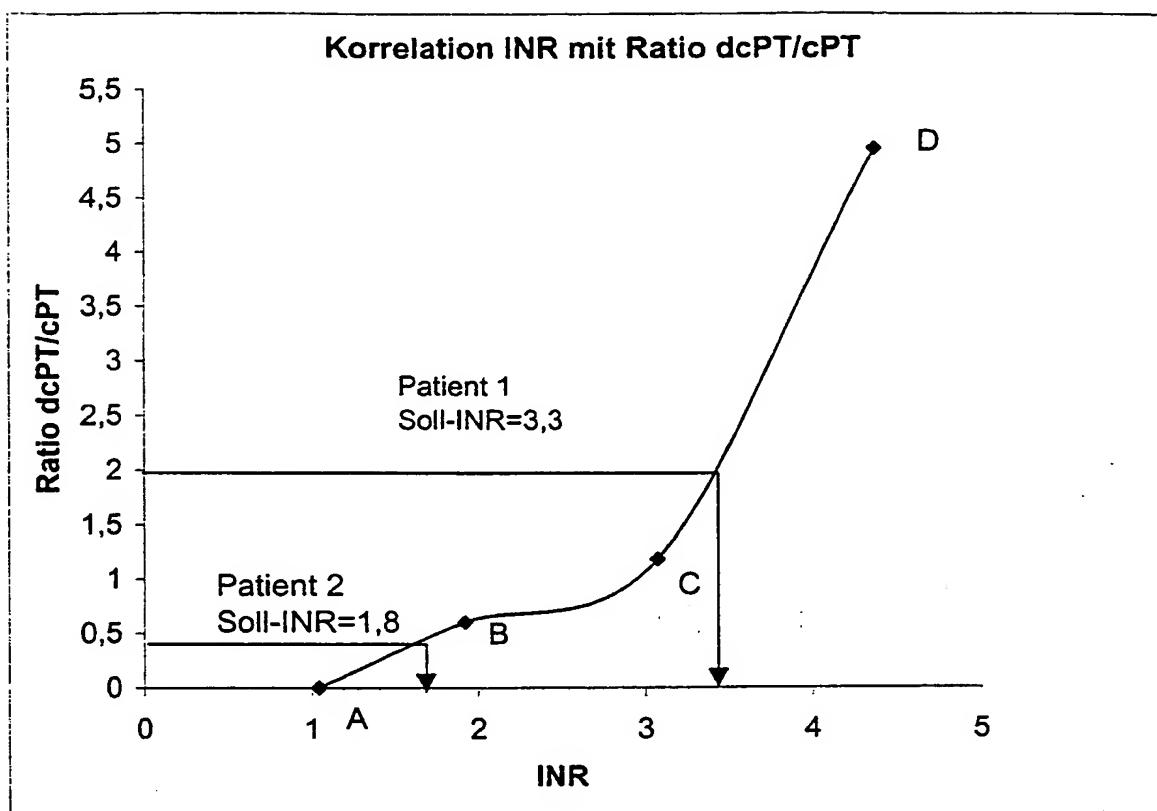


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

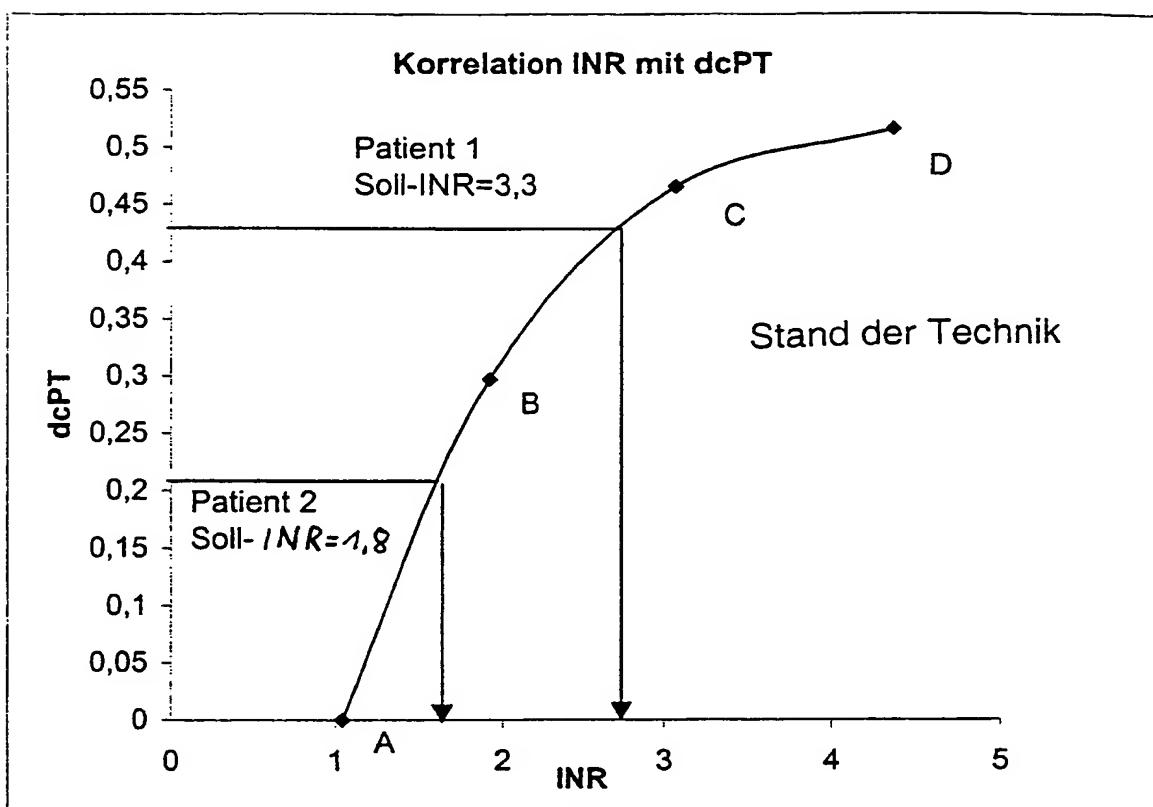


Fig. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/13123 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/86**, (74) Anwalt: **GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstrasse 49 A,
33/58, 33/543 D-91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/02748**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. August 2000 (11.08.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
199 37 654.9 14. August 1999 (14.08.1999) DE
199 41 447.5 31. August 1999 (31.08.1999) DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN** [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Str. 3a, D-91056 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **BERTLING, Wolf** [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 30. August 2001

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR INDIRECTLY DETERMINING THE BLOOD-CLOTTING STATUS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR INDIREKTEN BESTIMMUNG DES BLUTGERINNUNGSSTATUS

(57) Abstract: The invention relates to a method for indirectly determining the blood-clotting status. The inventive method comprises the following steps: a) collecting body fluids which contain a protein that can be modified by a vitamin K-dependent γ -carboxylase, b) determining at least two concentrations selected from a group consisting of a first concentration (C1) of carboxylated protein, a second concentration (C2) of decarboxylated protein and an entire concentration (C3) of carboxylated and decarboxylated protein, whereby the first concentration (C1) is determined using a first antibody (A1), the second concentration using a second antibody (A2) and the third concentration (C3) using a third antibody (A3), c) generating a first quotient (Q1) from the first (C1) and second concentration (C2) or generating a second quotient (Q2) from the third (C3) and first concentration (C1) or generating a third quotient (Q3) from the third (C3) and second concentration (C2), whereby a concentration (C1, C2, C3) which has not been determined in step b) and which is required for generating the first (Q1), the second (Q2) or the third quotient (Q3) is calculated according to the following relation: C3 - C2 = C1 and d) the first, second or third quotient (Q1, Q2, Q3) are correlated with the blood-clotting status.

WO 01/13123 A3

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten: a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält; b) Ermittlung von mindestens zwei Konzentrationen ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einer ersten Konzentration (C1) an carboxylierten Protein, einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Protein und einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein, wobei die erste Konzentration (C1) unter Verwendung eines ersten Antikörpers (A1), die zweite Konzentration unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2) und die dritte Konzentration (C3) unter Verwendung eines dritten Antikörpers (A3) ermittelt wird; c) Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2), oder Bildung eines zweiten Quotienten (Q2) aus dritter (C3) und erster Konzentration (C1), oder Bildung eines dritten Quotienten (Q3) aus dritter (C3) und zweiter Konzentration (C2), wobei eine zur Bildung des ersten (Q1), zweiten (Q2) oder dritten Quotienten (Q3) erforderliche und bei Schritt lit. (b) nicht ermittelte Konzentration (C1, C2, C3) gemäß folgender Beziehung: C3 - C2 = C1 errechnet wird; und d) Korrelation des ersten, zweiten oder dritten Quotienten (Q1, Q2, Q3) mit dem Blutgerinnungsstatus.

WO 01/13123 A3



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401167GA	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/02748	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/08/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/08/1999

Anmelder

NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEK

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
 - Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
 - in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
 - zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02748

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/86 G01N33/58 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 252 712 A (FURIE BRUCE E ET AL) 12. Oktober 1993 (1993-10-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-20
X	US 4 769 320 A (FURIE BRUCE E ET AL) 6. September 1988 (1988-09-06) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-20 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetragen)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

19. Februar 2001

27/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Int.	ales Aktenzeichen
PCT/DE 00/02748	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WEINSTOCK DAVID M ET AL: "Comparison of plasma prothrombin and factor VII and urine prothrombin F1 concentrations in patients on long-term warfarin therapy and those in the initial phase." AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, Bd. 57, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 193-199, XP002092275 ISSN: 0361-8609 Zusammenfassung ---	1-20
X	DE 40 08 546 A (TAKARA SHUZO CO) 20. September 1990 (1990-09-20) Ansprüche 1-6 ---	1-20
X	WO 99 09058 A (KAEKOENEN SANNA MARIA ; VAEAENAENEN H KALERVO (FI); HELLMAN JUKKA () 25. Februar 1999 (1999-02-25) Seite 27, Zeile 1 - Zeile 10 ---	1-20
E	WO 00 58732 A (KAEKOENEN SANNA MARIA ; VAEAENAENEN H KALERVO (FI); LOEVGREN TIMO () 5. Oktober 2000 (2000-10-05) das ganze Dokument ---	1-20
A	US 4 780 410 A (MOTOHARA KUNIHIKO ET AL) 25. Oktober 1988 (1988-10-25) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02748

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
US 5252712 A	12-10-1993	US 4769320 A	AT 52141 T	DE 3577233 D	06-09-1988 15-05-1990 23-05-1990
		EP 0182495 A	JP 1761807 C	JP 4041000 B	28-05-1986 28-05-1993 06-07-1992
		JP 61117457 A			04-06-1986
US 4769320 A	06-09-1988	AT 52141 T	DE 3577233 D	EP 0182495 A	15-05-1990 23-05-1990 28-05-1986
		JP 1761807 C	JP 4041000 B	JP 61117457 A	28-05-1993 06-07-1992 04-06-1986
		US 5252712 A			12-10-1993
DE 4008546 A	20-09-1990	JP 2242696 A	JP 7039439 B		27-09-1990 01-05-1995
WO 9909058 A	25-02-1999	EP 1003778 A			31-05-2000
WO 0058732 A	05-10-2000	KEINE			
US 4780410 A	25-10-1988	JP 1843365 C	JP 5043357 B	JP 60060557 A	12-05-1994 01-07-1993 08-04-1985
		AT 48037 T	CA 1234045 A	DE 3480494 D	15-12-1989 15-03-1988 21-12-1989
		EP 0142634 A	KR 8801338 B	NO 843591 A, B,	29-05-1985 25-07-1988 14-03-1985

THIS PAGE BLANK (USPTO)